

IDENTIFICACIÓN Y SÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE PLANTAS Y HONGOS DE CANARIAS, NORTE DE AFRICA Y SUDAMÉRICA.

Jaime Bermejo^{1,2}, Francisco León¹, Ignacio Brouard¹, Juan C. Hernández¹, Jorge Triana^{2,3}, Mariana López^{2,3}, José L. Eiroa^{2,3}, Francisco J. Pérez^{2,3}, Francisco Estévez^{2,4}, José Quintana^{2,4}, Samir Benayache⁵, Fadila Benayache⁵

¹ Instituto de Productos Naturales y Agrobiología CSIC- Instituto Universitario de Bio-Orgánica "A. González", Avda. Astrofísico Francisco Sánchez 3, 38206, La Laguna, Tenerife

² Instituto Canario de Investigación del Cáncer ICIC, Tenerife, Spain

³ Departamento de Química, Unidad Asociada al CSIC, Instituto Canario de Investigación del Cáncer, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

⁴ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad Asociada al CSIC, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Plaza Dr. Pasteur s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

⁵ Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles et Synthèse de Substances Bioactives, Equipe Associee a` l'A.N.D.R.S., Université Mentouri, Route de Aïn El Bey, 25 000 Constantine, Algeria

ÍNDICE:

- 1. INTRODUCCIÓN**
 - 2. ESTUDIO DE ESPECIES ENDÉMICAS DE CANARIAS**
 - 2.1. *Dracaena draco*
 - 2.2. *Asteraceae endémicas de Canarias*
 - 3. ESTUDIO DE ESPECIES PROCEDENTES DEL NORTE DE ÁFRICA**
 - 4. ESTUDIO DE MACROMICETOS PROCEDENTES DE COLOMBIA**
 - 5. CONCLUSIONES**
 - 6. REFERENCIAS**
-

1. INTRODUCCIÓN

La investigación de los productos naturales se asocia de forma común con el estudio de las sustancias que se aíslan de organismos vivos en aspectos que van desde los más convencionales, como los relacionados con la elucidación de su estructura y su síntesis química, hasta otros que, abarcan su biosíntesis, degradación y papel fisiológico. El ámbito de actuación de esta rama de la química se centra preferentemente en el estudio de las moléculas del metabolismo secundario, que podemos definir como aquellos que se generan en rutas metabólicas aparentemente no esenciales para la supervivencia del organismo. Por su propia naturaleza, estos metabolitos secundarios resultan ser con frecuencia particulares para la especie biológica investigada y, aunque en muchos casos se desconoce su función fisiológica, la singularidad de estas sustancias particulariza en ciertas especies formas específicas de acción biológica que pueden, y de hecho son, del más amplio interés (Bohlin 1998).

Actualmente, la química de Productos Naturales posee una gran importancia, ya que nuevas sustancias, más o menos complicadas se descubren e investigan constantemente. La industria farmacéutica en la actualidad dirige grandes esfuerzos hacia el hallazgo de nuevos compuestos con actividades biológicas específicas, mediante la evaluación de extractos directos de distintos organismos vivos. La investigación en este campo pone énfasis en disponer de una buena y extensa colección de material de partida, fundamentalmente extractos, que cubran la mayor diversidad de géneros, especies y ecosistemas, de manera que puedan encontrar una amplia expresión de todo tipo de metabolitos secundarios, asegurando de esta forma una gran variedad estructural (Koehn and Newman 2009).

En esta área se encuentra el Instituto de Producto Naturales y Agrobiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC (Tenerife)- Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y el Instituto Canario de Investigación del Cáncer ICIC, que vienen desarrollando desde hace años diversos programas de investigación sobre sustancias procedentes de plantas superiores, hongos, líquenes, helechos, etc., a través de los cuales se han aislado y determinado las estructuras de muchos centenares de metabolitos secundarios nuevos, así como, la funcionalización y síntesis de ellos o análogos, algunos con significativa actividad farmacológica. Nuestro grupo de investigación, en particular tiene como objetivo, el descubrimiento de nuevos agentes farmacológicos en especial quimioterapéuticos, procedentes de diferentes fuentes endémicas de Canarias, del Norte de África y Sudamérica. Con la intención de profundizar en los resultados, mencionaremos los principales hallazgos encontrados, en nuestro grupo de investigación, de los que han surgido una serie de publicaciones internacionales que comentaremos a continuación.

2. ESTUDIO DE ESPECIES ENDÉMICAS DE CANARIAS

2.1 *Dracaena draco*

El grupo de los dragos está constituido por el taxón arborescente del género *Dracaena*, los cuales presentan una distribución diferente entre el oeste y el este de África, incluyendo los archipiélagos adyacentes. En el oeste se encuentran dos especies: *D. draco*, con la subespecie *draco* en los archipiélagos de Madeira, Cabo Verde, y Canarias y la subespecie *ajgal* en el norte de Marruecos, y la especie *D. tamaranae* restringida a la isla de Gran Canaria. En el este de África encontramos las especies *D. cinnabari* en la isla de Socotora y algunas especies continentales como: *D. schizantha*, *D. ombet*, *D. serratula* (Marrero *et al* 1998; Sánchez-Pinto 2001).

El *D. draco* spp *draco* es uno de los árboles emblemáticos de la flora Canaria, es un árbol de porte variable, crece en zonas cálidas preferentemente en lugares expuestos a la humedad de los vientos alisios a una altitud de entre 100-600 metros. En la antigüedad la resina que exuda el árbol denominada "Sangre de drago" fue un producto muy apreciado por sus propiedades medicinales e industriales (Santos 1979).

Desde el punto de vista fitoquímico se habían aislado saponinas de tipo dracogenina y flavonoides tipo flavans, homoisoflavans, flavonoles, entre otros. En el curso de nuestras investigaciones en este tema en particular, hemos estudiado la sangre de drago de las especies presente en el oeste de África (*D. draco* spp *draco*; *D. draco* spp *ajgal* y *D. tamaranae*) para determinar el patrón de flavonoides presentes en cada una de ellas, concluyendo que si bien se veían ciertas diferencias entre la subespecie *draco* y *ajgal*, no llegaban a ser significativas, en cambio, al compararlas con *D. tamaranae*, esta última no presentaba por lo menos tres sustancias encontradas en los *D. draco*. Lo anterior nos permitió observar la diferencia química entre estas dos especies y sirvió como soporte para poder establecer *D. tamaranae* como una especie taxonómicamente diferente (González *et al* 2004).

De la raíz de *D. draco* spp *draco*, se han podido aislar e identificar veintitrés sustancias, veintidós de ellas conocidas (saponinas esteroidales y flavonoides) y una nueva saponina esteroideal de tipo furostanol denominada icogenina **1** (figura 1), esta mostró un extraordinario efecto antiproliferativo frente a células de leucemia humana HL-60, induciendo apoptosis correlacionada con el aumento del rompimiento proteolítico de la poli ADP ribosa polimerasa-1, verificándose esto último, por medio de western blot con el fragmento a 85 KDa (Hernández *et al* 2004).

De las hojas de *D. draco* spp *draco*, mediante técnicas cromatográficas convencionales, hemos podido separar y determinar las estructuras de diecinueve sustancias, de ellas diecisiete conocidas (flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides) y dos nuevos metabolitos: una

saponina esteroidea denominada icodesida (**2**) y un flavonoide tipo homoisflavonoide denominado dracol (**3**) (figura 1). Se evaluó la actividad citotóxica de **2** y **3**, frente a células tumorales HL-60, A-431, HeLa, SK-OV3. Observándose que únicamente **2** fue activo frente a HL-60 y A-431 con un IC₅₀ de 9 y 16 µM, respectivamente. El compuesto **3** fue inactivo (Hernández *et al*/2006).

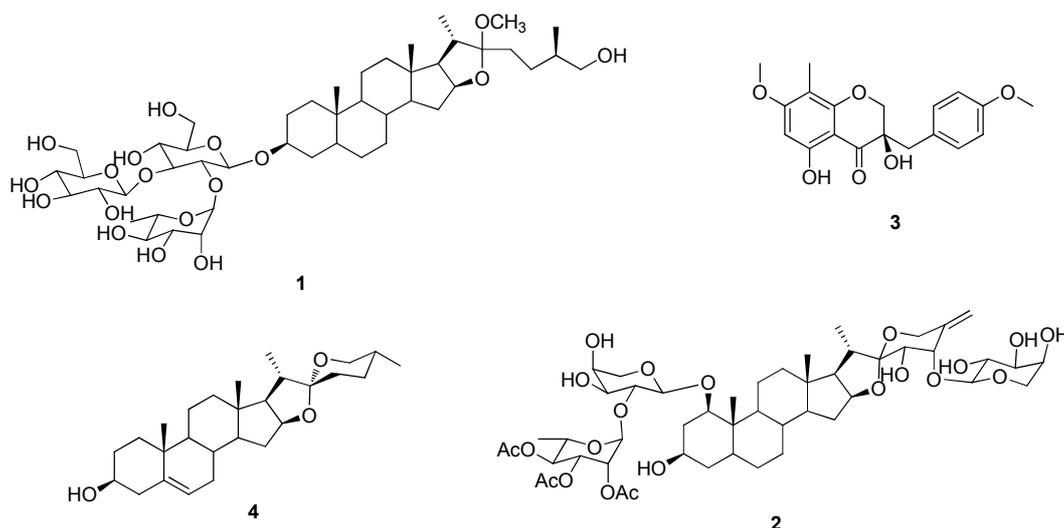


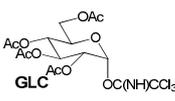
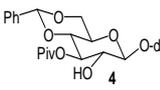
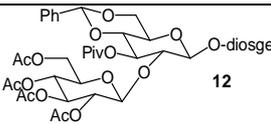
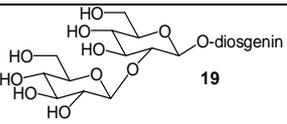
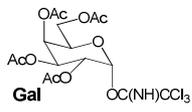
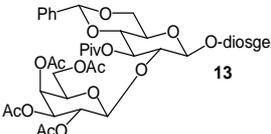
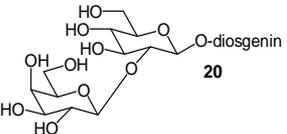
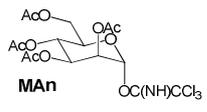
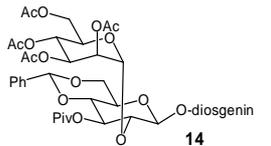
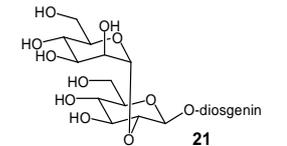
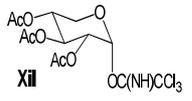
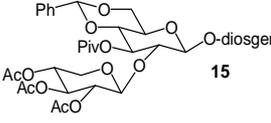
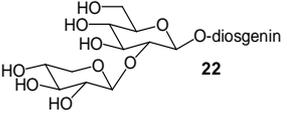
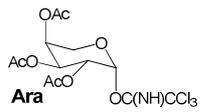
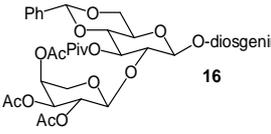
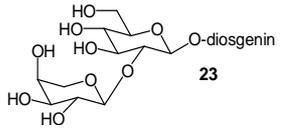
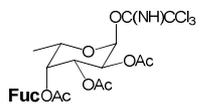
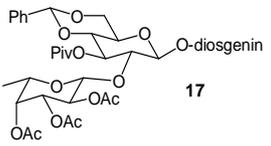
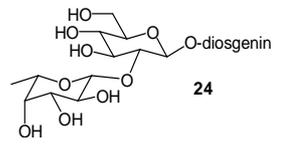
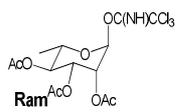
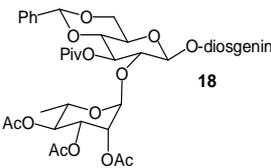
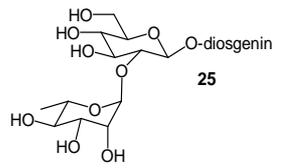
Figura 1. Compuestos aislados de *Dracaena draco*.

Con el fin de profundizar en la actividad de las saponinas esteroidales, se ha desarrollado una metodología sintética, manteniendo el núcleo de la diosgenina (**4**) (figura 1), una saponina esteroidea muy habitual en *D. draco*, y que presenta una apreciada actividad citotóxica. Los análogos se sintetizaron con un derivado común la 3-β-glucosa-diosgenina convenientemente protegida, a la cual se le fueron uniendo distintos monosacáridos en la posición 2 de la glucosa (glucosa, galactosa, manosa, xilosa, ramnosa, arabinosa y fucosa). Ver tabla 1.

Una vez obtenidos los análogos de saponinas se evaluó la citotoxicidad frente a tres líneas celulares tumorales HL-60, U937 y SK-MEL-1, no todos los análogos fueron igualmente citotóxicos, se observó que el más activo fue el que poseía la ramnosa unida en la posición 2 de la glucosa, así se hicieron dos derivados acetilados: un mono acetilado en la posición 6 de la glucosa y un di acetilado en la posiciones 6 de la glucosa y 4 de la ramnosa, estos derivados fueron sintetizados mediante una enzima específica para acetilar, la novoenzima 435. Estos derivados fueron los más citotóxicos frente a todas las líneas ensayadas con un IC₅₀ promedio de entre 4 a 30 µM. Observamos que dichos compuestos inducen daño en el ADN en la fase G₂/M (como es el caso de la mayoría de agentes de daño al ADN). La apoptosis fue precedida por una rápida liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol y subsecuente activación de caspasas involucrando la caspasa-9 y la caspasa-3. Estos datos podrían contribuir al diseño

de fármacos como posible agente quimioterapéutico o quimiopreventivo (Hernández *et al* 2008).

Tabla 1. Productos de acoplamiento.

donor	acceptor	product	product	Yield (%)
 <p>GLC</p>	 <p>4</p>	 <p>O-diosge 12</p>	 <p>O-diosgenin 19</p>	(77)
 <p>Gal</p>	"	 <p>O-diosger 13</p>	 <p>O-diosgenin 20</p>	(50)
 <p>Man</p>	"	 <p>O-diosgenin 14</p>	 <p>O-diosgenin 21</p>	(52)
 <p>Xil</p>	"	 <p>O-diosger 15</p>	 <p>O-diosgenin 22</p>	(64)
 <p>Ara</p>	"	 <p>O-diosgenin 16</p>	 <p>O-diosgenin 23</p>	(56)
 <p>Fuc</p>	"	 <p>O-diosgenin 17</p>	 <p>O-diosgenin 24</p>	(58)
 <p>Ram</p>	"	 <p>O-diosgenin 18</p>	 <p>O-diosgenin 25</p>	(49)

2.2 Asteraceas endémicas de Canarias.

Las islas Canarias al igual que la gran mayoría de islas de origen volcánico se suelen caracterizar por la existencia de paisajes vegetales muy diversos, así como de la existencia de una gran variedad de nichos ecológicos que tienen como resultado distintas especies vegetales, con un gran número de endemismos que pueden variar incluso de una isla a otra y que son el resultado de una serie de procesos de evolución vegetal, como es el caso de las plantas vasculares, de las aproximadamente 1900 especies presentes de manera salvaje en Canarias siendo casi el 30 % endémicas. Una de las familias que más endemismos agrupa en Canarias son las Asteraceae (Compuestas), con unos 32 géneros presentes en Canarias de los cuales podemos resaltar: *Tanacetum*, *Pulicaria*, *Gonospermum*, *Lugoa*, etc, (Kunkel *et al* 1992). Nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia en el estudio de los metabolitos secundarios presentes en Compuestas, a continuación mencionaremos una serie de trabajos que se han desarrollado en parte con el apoyo económico del ICIC.

El género *Pulicaria* está representado en las Islas Canarias por tres especies: *Pulicaria crispa*, *P. burchardii* y *P. canariensis*, las dos últimas son endémicas, la *P. canariensis* está representada por dos subespecies la *lanata* y *canariensis*. Del extracto etanólico de la parte aérea de la *P. canariensis* spp *canariensis* hemos podido aislar y determinar las estructuras de veinte compuestos trece de ellos nuevos en la bibliografía científica: pulicadienos A (**5**), B (**6**) y C (**7**); pulicanona (**8**); pulicanol (**9**); pulicanarales A (**10**), B (**11**) y C (**12**); pulicanadiales A (**13**) y B (**14**); pulicanadienol (**15**), pulioplomanonas A (**16**) y B (**17**). Se realizaron actividades citotóxicas frente a células de leucemia humana HL-60 a los productos nuevos y algunos de sus derivados acetilados y/o metilados (ver figura 2), observándose que el compuesto **8a** fue el más activo y su citotoxicidad fue causada por inducción de apoptosis mediante activación de caspasas (Triana *et al* 2005).

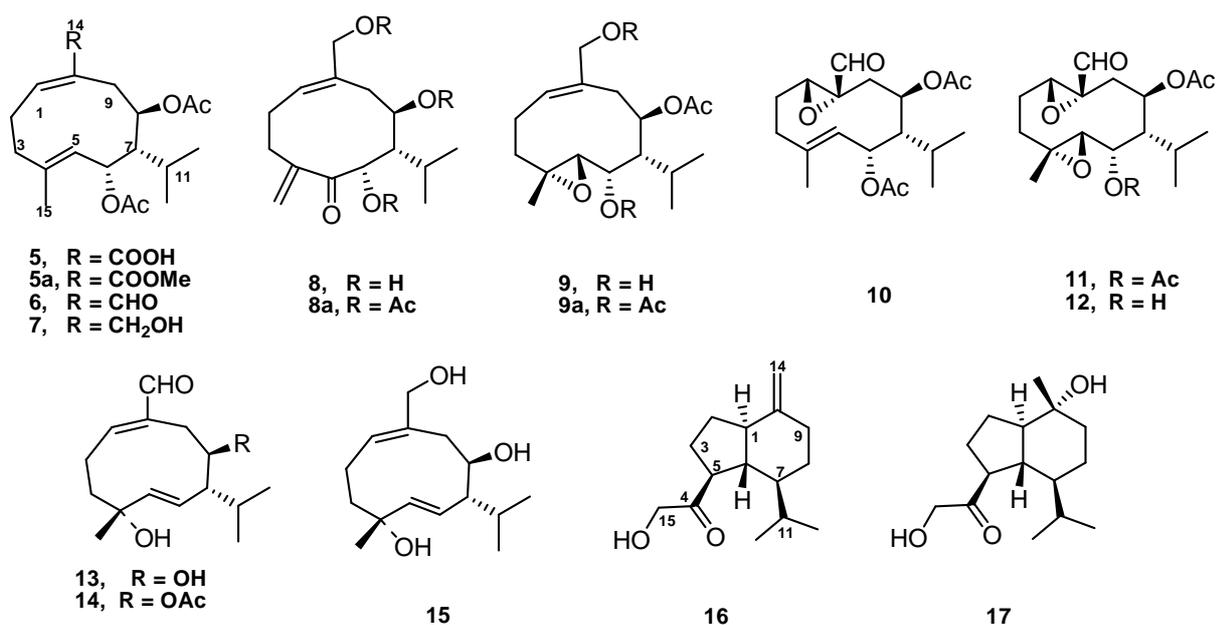


Figura 2. Compuestos nuevos aislados de *Pulicaria canariensis* spp *canariensis*.

La subtribu de la *Gonosperminae* es una de las doce tribus reconocidas de la Anthemideae (Asteraceae), proporcionan uno de los ejemplos de distribución discontinua entre las Islas Canarias y el continente Africano específicamente en Sudáfrica. La distribución geográfica de los miembros de esta subtribu parecía apoyar en principio un enlace durante el periodo terciario, entre la flora Canaria y la flora Rand de Sudáfrica. *Gonosperminae* está compuesta por dos géneros endémicos de las islas Canarias, el *Gonospermum* (cuatro especies), *Lugoa* (una especie) y el *Inulanthera* constituido por diez especies presentes en el Noreste de Sudáfrica (Bremer and Humpries 1993). Nuestras investigaciones basadas en el estudio sistemático de diferentes especies de *Gonospermum* recolectadas en distintas Islas Canarias, nos apoyan la propuesta de segregación del género *Inulanthera* del grupo *Gonosperminae* tomando como base el predominio de las lactonas tipo germacrano y eudesmano presente en las especies de las Islas Canarias, frente al predominio de las lactonas tipo guayanolida presentes en las especies africanas (*Inulanthera*), estas últimas presentan una mejor relación con los géneros europeo-asiáticos, debido no sólo al hecho de la presencia de las mismas lactonas, sino al mismo patrón de compuestos biogenéticamente similares, argumento indispensable desde el punto de vista quimiotaxonómico. Estos estudios junto con los bibliográficos han mostrado que el género *Tanacetum* vendrá a estar mucho más relacionado con *Gonosperminae* que el *Inulanthera*, y que *Tanacetum*, *Lugoa* y *Gonospermum* podrían ser agrupados en un único taxón endémico de las Islas Canarias (Oberprieler *et al* 2007). Las anteriores conclusiones fueron generadas por un estudio sistemático como se comentó anteriormente de las *Gonosperminae* presentes en Canarias, de las cuales hemos resaltado tres trabajos realizados con el apoyo del ICIC. Del extracto etanólico de la parte aérea de

Gonospermum elegans, hemos podido aislar e identificar diecinueve compuestos cuatro de ellos nuevos, un sesquiterpeno: eleganodiol (**18**) y tres lactonas sesquiterpénicas: eleganolactona A (**19**), B (**20**) y elegaina (**21**), (figura 3) las estructuras de los nuevos compuestos fueron elucidadas por un amplio estudio espectroscópico, siendo la estructura de **20** determinada mediante difracción de rayos X de su derivado acetilado **20a**. También se evaluó la actividad citotóxica de este tipo de sustancias frente a células tumorales HL-60, observándose que el compuesto **19a** y **20a** fueron los más activos con un IC_{50} de 0,25 y 5,3 μ M, respectivamente (Triana *et al* 2003).

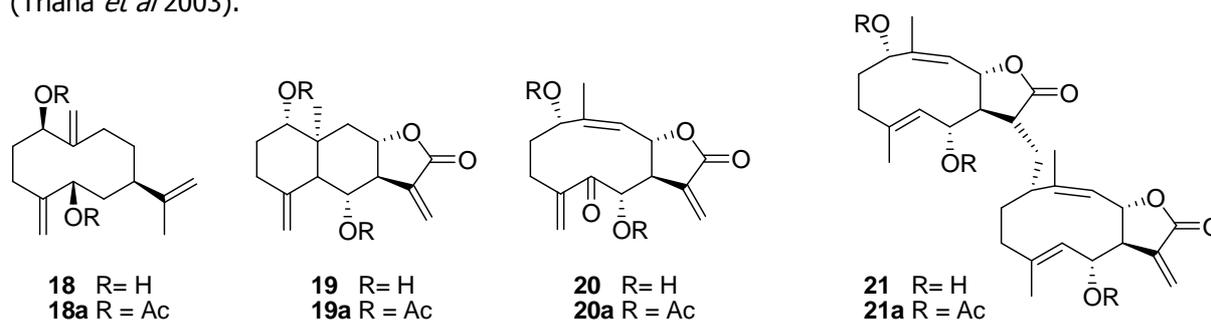


Figura 3. Compuestos nuevos aislados de *Gonospermum elegans*.

De la parte aérea de *G. gomerae* y *G. fruticosum* recolectados en la isla de la Gomera (figura 4), haciendo uso de diferentes métodos cromatográficos hemos podido identificar cinco nuevos compuestos. De *G. gomerae* dos nuevas lactonas sesquiterpénicas (**22**) y (**23**), mientras que de *G. fruticosum* las dos lactonas (**24** y **25**), y un sesquiterpeno lineal (**26**). Sus estructuras fueron determinadas por análisis espectroscópico, incluyendo RMN mono y bi-dimensional y masas (HR-EI-MS). También obtuvimos veinte compuestos conocidos, la estructura de estos fue confirmada por comparación de sus propiedades espectroscópicas con los datos publicados en la bibliografía. Así mismo, estábamos interesados en determinar si estas sustancias mostraban propiedades citotóxicas de una forma específica en la células, examinamos los efectos de varios sesquiterpenos aislados frente al crecimiento de cuatro líneas celulares tumorales humanas (HL-60, U-937, A549 y SK-MEL-1), los resultados mostraron que el compuesto **22a** fue el más activo frente a HL-60 y U937 con un IC_{50} de aproximadamente 10 μ M. La línea celular A549 fue la más resistente frente a todos los compuestos evaluados. La inhibición de crecimiento celular en HL-60 fue asociada con alteraciones en la progresión del ciclo celular y apoptosis a través de un mecanismo dependiente de caspasas (Triana *et al* 2008).

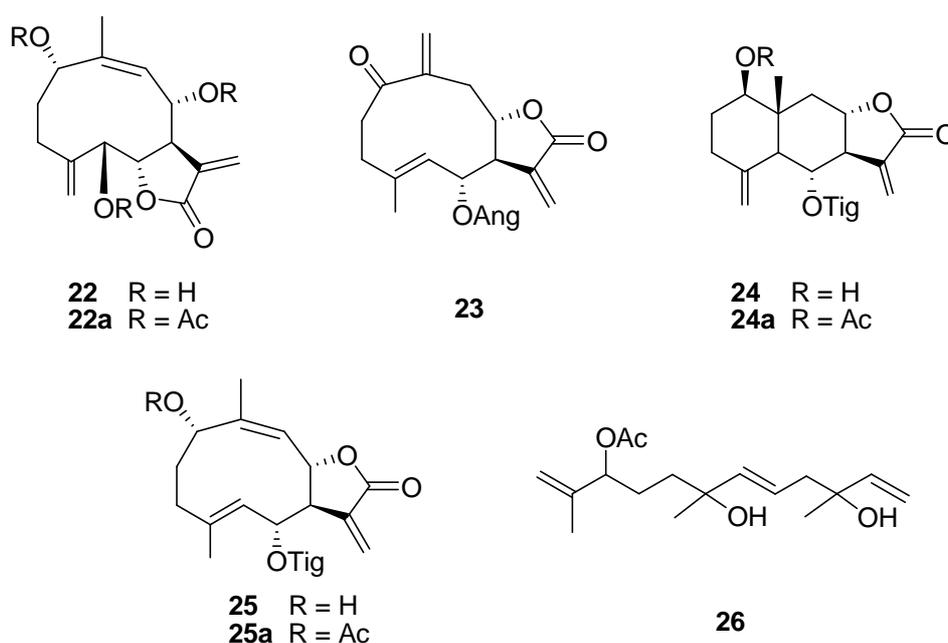


Figura 4. Compuestos nuevos aislados de *Gonospermum gomerae* y *G. fruticosum*.

El *G. fruticosum* está presente además de en la Isla de La Gomera, en Tenerife y el Hierro. Por tal motivo nos planteamos el estudio de varias poblaciones de *G. fruticosum*, con la finalidad de encontrar el tipo estructural y patrón de compuestos aislados. Así, estudiamos dos poblaciones en Tenerife y una en la Isla de El Hierro. Las poblaciones en Tenerife fueron recolectadas en Anaga y en Güimar, del estudio del extracto etanólico de la parte aérea de la *G. fruticosum* recolectado en Anaga (Tenerife) hemos podido aislar seis compuestos uno de ellos un sesquiterpeno nuevo en la bibliografía (**27**) (figura 5); de la recolectada en Güimar (Tenerife) aislamos e identificamos ocho compuestos, cuatro de ellos novedosos, todos sesquiterpenos del tipo del eudesmano (**27-30**) (figura 5) y del *G. fruticosum* recolectado en El Hierro pudimos aislar una nueva lactona sesquiterpénica (**31**) (figura 5), junto con siete compuestos conocidos. Todas las sustancias fueron identificadas mediante métodos espectroscópicos, principalmente RMN 1D y 2D, IR, y masas de alta resolución, desde el punto de vista químico hay que resaltar el hecho que únicamente hemos encontrado lactonas sesquiterpénicas en la población procedente de El Hierro, ya que se puede evaluar la colonización inter-islas y la radiación insular en esta especie en particular. Además se evaluó la citotoxicidad de los compuestos nuevos frente a tres líneas tumorales humanas la HL-60, U937 y SK-MEL-1, obteniéndose una baja actividad en las sustancias ensayadas (Triana *et al*/2010).

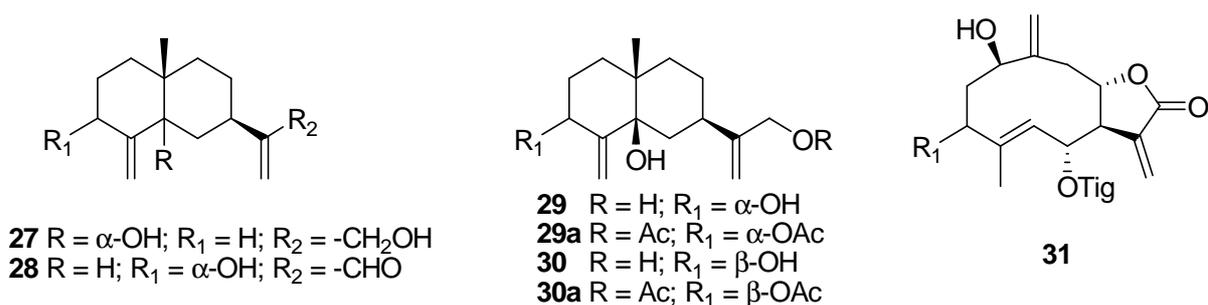


Figura 5. Compuestos nuevos aislados de *Gonospermum fruticosum* recolectados en Tenerife y en El Hierro.

3. ESTUDIO DE ESPECIES PROCEDENTES DEL NORTE DE ÁFRICA

Teniendo en cuenta la amplia colaboración que mantiene nuestro grupo de investigación con otros en Argelia, y en nuestro afán de investigar las propiedades biológicas de los Productos Naturales presentes en la flora del Norte de África (Argelia), siendo esta poco estudiada y, que por lo tanto, posee un alto potencial para encontrar nuevas sustancias con interés biológico. A continuación citaremos algunos de los trabajos resultantes.

El género *Eucalyptus* comprende más de 500 especies, actualmente nuevas variedades siguen descubriéndose. El *Eucalyptus* es nativo de Australia, Filipinas, Timor, entre otros. Es una especie ornamental y sus hojas y cortezas han sido y son utilizadas en diversos usos medicinales. También se ha utilizado para desecar amplios terrenos, es así como a mediados del siglo XIX, fue introducido por el Gobierno Francés en su ex colonia Argelia, para desecar terrenos pantanosos en la que existían grandes plagas de paludismo, estas especies necesitan de gran cantidad de agua para su crecimiento y produciendo la deshidratación del terreno evitando, de esta manera, la proliferación de mosquitos (Djema and Messaoudene 2009). A partir de entonces se extendió su uso por casi todas las zonas templadas del planeta. De la parte aérea de *E. occidentalis* recolectado en Argelia, hemos aislado e identificado un nuevo flavonoide (**32**), junto con tres compuestos conocidos. Los flavonoides aislados (**32** y **33**) (figura 6), fueron ensayados frente a la línea celular de leucemia humana promielocítica HL-60 encontrándose una alta citotoxicidad con un IC₅₀ de 1,7 y 7,4 μ M respectivamente. Estos compuestos inducen cambios morfológicos y fragmentación de ADN internucleosomal, característico de apoptosis el cual está mediado por activación de caspasa-3 y caspasa-8 y liberación de citocromo c (Benyahia *et al* 2004). Del *E. cladocalyx* hemos aislado un novedoso 28-nortriterpeno con esqueleto de ursano al que hemos denominado cladocalol (**34**) (figura 6), que a su vez esta formulado, éste ha sido el primer reporte de un 28-norursano. Su estructura

fue establecida mediante estudios de RMN mono y bi-dimensionales, masas y análisis de rayos X de su derivado acetilado **34a**, así como reacciones químicas para obtener su derivado de hidrólisis **34b**. Se ensayó el efecto citotóxico de dichos compuestos frente a la línea celular HL-60, observándose una actividad más o menos baja (Benyahia *et al* 2005).

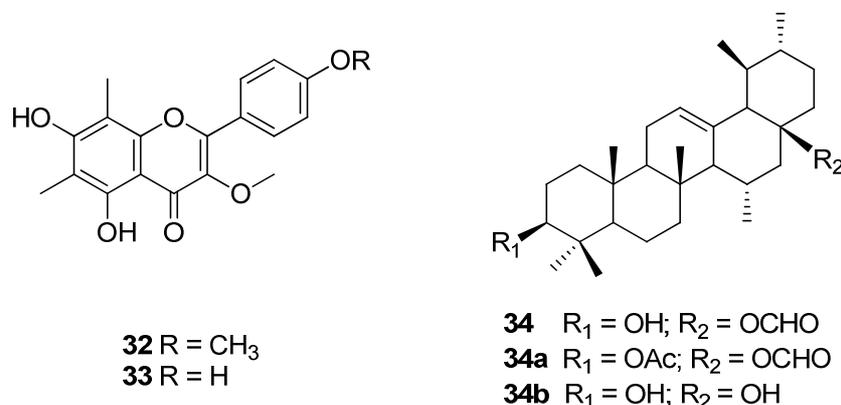


Figura 6. Compuestos nuevos aislados de *Eucalyptus occidentales* y *E. cladocalyx*.

Como hemos mencionado anteriormente, las Asteraceas son una familia extensa y ubicada ampliamente en el Mediterráneo como es el caso de Argelia. Así hemos estudiado la *Matricaria chamomilla*, *Achillea ligustica* y *Centaurea africana*, debido a su amplio uso en la medicina tradicional argelina. La *M. chamomilla* presenta un amplio uso medicinal como para los dolores de estómago, relajante, etc. De ella hemos podido aislar e identificar mediante métodos espectroscópicos y comparación con datos de la literatura, seis compuestos dos de ellos nuevos, una lactona sesquiterpénica, denominada matricolona (**35**) y un monoterpene glicosidado el chamolol (**36**) (figura 7). Al evaluar dichos compuestos, se encontró una baja actividad citotóxica frente a células de leucemia humana HL-60 (Zaiter *et al* 2007).

De la planta aromática *A. ligustica* hemos podido separar y determinar la estructura de ocho compuestos uno de ellos nuevo en la literatura científica. Esta es una lactona sesquiterpénica del tipo de las guayanolidas a la que hemos denominado algerianolida **37** (figura 7), dicha lactona presenta en su estructura un átomo de cloro, lo cual es poco común en las lactonas sesquiterpénicas aisladas del género *Achillea*. Habría que resaltar que es el primer caso de lactonas del tipo de guayanolidas en la que el átomo de cloro está en la posición 2 (Boudjerda *et al* 2008).

De las flores y parte aérea de la especie endémica de Argelia y Túnez *C. africana*, hemos podido aislar e identificar doce compuestos, entre ellos un flavonoide glicosidado y acilado denominado algerianina (**38**) (figura 7). Su estructura fue establecida mediante análisis químico y espectroscópico principalmente RMN 1D y 2D, masas y UV. La algerianina mostró una

actividad media frente a las células de leucemia humana HL-60, con un IC₅₀ de 26.1 μM (Seghiri *et al* 2009).

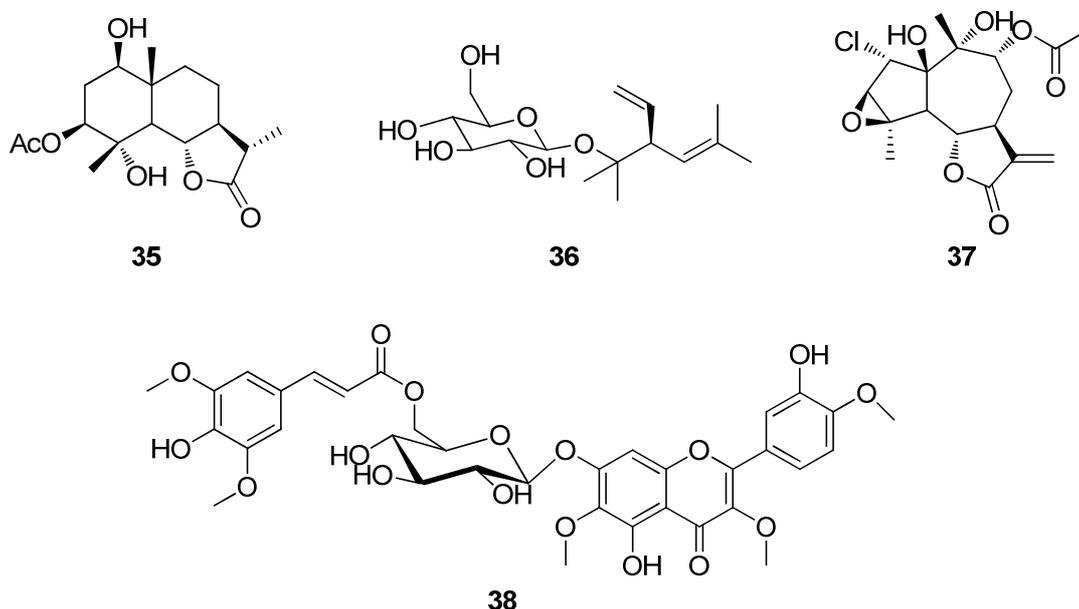


Figura 7. Compuestos nuevos aislados de *Matricaria chamomilla*, *Achillea ligustica* y *Centaurea africana*.

4. ESTUDIO DE MACROMICETOS PROCEDENTES DE COLOMBIA

Otra de las líneas de trabajo que hemos desarrollado en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", es la búsqueda de nuevas moléculas bio-activas principalmente en hongos de Canarias y Sudamérica. Si bien es conocido que Colombia es un país privilegiado en cuanto a su biodiversidad, también lo es el hecho de que el estudio químico y farmacológico de metabolitos secundarios se ha efectuado casi en su totalidad en plantas superiores, abandonando otras fuentes que son tan o más promisorias que éstas. Tal es el caso de los hongos, los cuales se encuentran representados en nuestro medio por un sin número de especies, algunas de las cuales se han venido empleando por los indígenas y campesinos, tanto desde el punto de vista alimenticio como el ritual y medicinal. Sin embargo, el aprovechamiento de los hongos es muy limitado en contraste con otras culturas, en donde su aplicación medicinal se ha realizado en forma amplia y desde la antigüedad (Franco-Molano *et al* 2010). A continuación resaltaremos algunos de los trabajos realizados en hongos recolectados en Colombia, con la ayuda del Instituto Canario de Investigación del Cáncer.

Uno de los géneros más prolíficos en cuanto a cantidad y calidad de metabolitos aislados principalmente triterpenos, es el género *Ganoderma*, ampliamente usado en la medicina

tradicional oriental (china, japonesa, coreana, vietnamita, etc) (Paterson 2006). Del *Ganoderma australe*, recolectado en la región del Nuquí, en el Departamento del Choco, Colombia, hemos podido aislar e identificar mediante diferentes métodos espectroscópicos nueve compuestos, de los cuales seis fueron triterpenos del tipo del lanostano polioxigenados, dos de ellos nuevos en la literatura científica: la austrolactona (**39**) y el ácido austrálico (**40**) (figura 8). Cabe resaltar la presencia en la estructura de la austrolactona de un anillo oxepánico entre las posiciones C-12 y C-23, siendo éste el primer caso en la bibliografía. Hemos evaluado la actividad citotóxica de los triterpenos obtenidos frente a células de leucemia humana HL-60, encontrando una moderada actividad (León *et al* 2003). Del basidiomiceto *Laetiporus sulphureus* conocido en Colombia como el "pollo de la madera" y consumido de manera habitual por los habitantes de la zona, hemos aislado e identificado diez compuestos, uno de ellos el triterpeno de tipo lanostano denominado ácido 3-oxosuofurénico (**41**) (figura 8). Se evaluó su actividad citotóxica frente a HL-60, observándose baja actividad (León *et al* 2004).

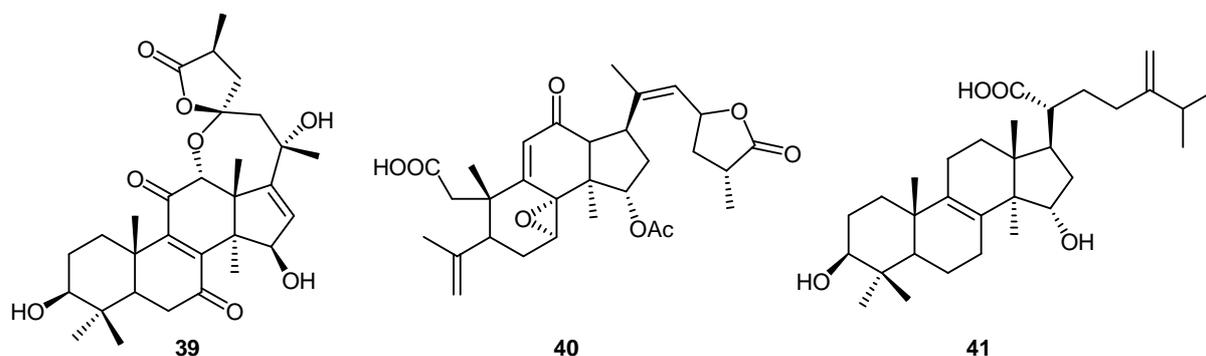
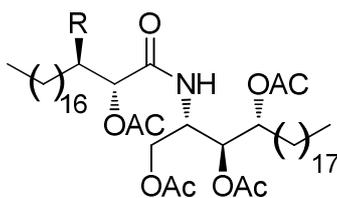


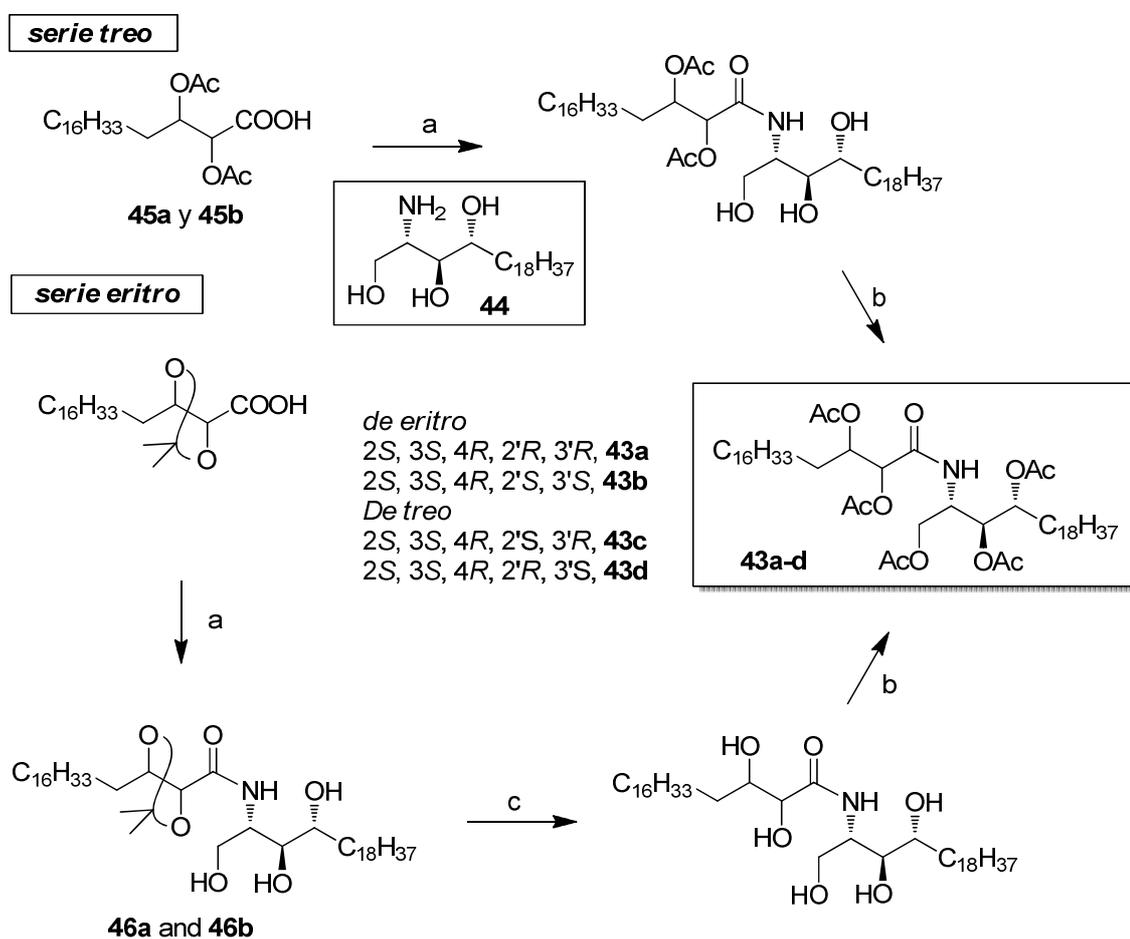
Figura 8. Compuestos nuevos aislados de *Ganoderma australe* y *laetiporus sulphureus*.

Del hongo *Trametes menziesii*, recolectado en la región de Valencia, Departamento de Córdoba, Colombia, hemos conseguido aislar e identificar, después de acetilar la mezcla, las ceramidas trametenamida A (**42**), y B (**43**) (figura 9), junto con cinco compuestos conocidos. Las estructuras fueron determinadas mediante análisis espectroscópico y comparación con datos de la literatura. La trametenamida B presenta en su porción de ácido dos hidroxilos en α y β al grupo carbonilo, siendo esto el primer ejemplo de ceramidas con ese patrón de hidroxilación. La estereoquímica de los hidroxilos en C-2 y C-3 del ácido, fue imposible determinar debido principalmente a la poca cantidad de material aislado, por tal razón y con el objetivo de conocer su estereoquímica, así como de tener suficiente material para poder ser evaluada su citotoxicidad, nos planteamos la síntesis total de los cuatro diastereoisómeros. Desarrollamos la síntesis de la esfingoina común (**44**), y los ácidos de la serie treo (**45a** y **45b**) y eritro (**46a** y **46b**), para poder generar las ceramidas **43a-d** siguiendo el procedimiento mostrado en la figura 10.



- 42.** R = H;
43. R = OAc;

Figura 9. Compuestos nuevos aislados de *Trametes menziesii*.



Reactivos y condiciones: (a) HOBt, EDCI or N-hydroxy succinimida, esfingosina **44**; (b) Ac₂O, Py, r.t.; (c) HCl (3N), MeOH, r.t.

Figura 10. Método sintético para la obtención de las ceramidas **43a-d**.

La comparación de los datos analíticos y espectroscópicos de **43** y las ceramidas sintetizadas **43a-d**, nos permitió concluir sin lugar a dudas la estereoquímica en **43** como **43a**, siendo este el primer caso en la literatura con este tipo de hidroxilación. A su vez evaluamos la actividad citotóxica de **42** y **43a-d**, frente a la línea celular de melanoma humano SK-MEL-1, estas ceramidas presentan un elevado efecto citotóxico con un IC_{50} de entre 4 a 10 μM , este fue causado por inducción de apoptosis debido al rompimiento de la ADP-ribosa polimerasa-1, y procesamiento de la procaspasa 9 y procaspasa 8 (León *et al*/2006).

Del basidiomiceto *Suillus luteus* recolectado en el Parque Nacional Natural del Embalse del Neusa, en Colombia, hemos podido aislar e identificar once compuestos uno de ellos nuevo, la ceramida denominada suillumida **46**. La característica principal de esta sustancia fue la presencia de un anillo dihidrofuránico en la parte de la esfingosina. A este nuevo compuesto, junto con su derivado peracetilado **46a**, se le evaluó la actividad citotóxica, frente a las células de melanoma humano SK-MEL-1, observándose una actividad elevada IC_{50} de 9,7 y 11,6 para **46** y **46a** (figura 11), respectivamente (León *et al*/2008)

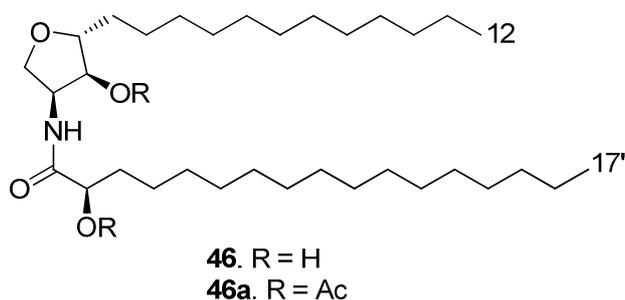


Figura 11. Compuestos nuevos aislados y derivados de *Suillus luteus*.

5. CONCLUSIONES

El uso de los productos naturales aislados de diferentes fuentes orgánicas, va desde la cosmética hasta la medicina, su utilización se puede remontar desde épocas muy antiguas y se ha mantenido hasta nuestros días. El empleo de modernos métodos analíticos, ha facilitado la posibilidad de encontrar compuestos novedosos, en este trabajo hemos realizado un pequeño resumen de los logros obtenidos por nuestro grupo de investigación con el apoyo económico del Instituto Canario de Investigación del Cáncer. Nosotros hemos aislado de diferentes fuentes, saponinas, flavonoides, sesquiterpenos, triterpenos, ceramidas entre otros, muchos de ellos nuevos en la literatura científica. También, a la gran mayoría de metabolitos aislados e

Jaime Bermejo, Francisco León, Ignacio Brouard, Juan C. Hernández, Jorge Triana, Mariana López, Jose L. Eiroa, Francisco J. Pérez, Francisco Estévez, José Quintana, Samir Benayache, Fadila Benayache

identificados, se les ha evaluado su actividad citotóxica frente a distintas líneas tumorales humanas (HL-60, SK-MEL-1, etc).

Resaltamos los estudios realizados de Asteraceae presentes en Canarias, reforzando la propuesta de conformar un género con especies endémicas de Canarias, como consecuencia de los resultados de estudios fitoquímicos de *Gonospermum* entre otros géneros. En cuanto a la actividad citotóxica las ceramidas **43a-d**, presentaron unos IC_{50} , con buen potencial. Nos proponemos continuar sintetizando algunos derivados o estudiando hongos del mismo género y procedencia.

Ponemos también de manifiesto en nuestros trabajos la estrecha relación que mantenemos con el personal de distintas Universidades, como la de Las Palmas de Gran Canaria, Nacional de Colombia y Mentouri en Argelia. Nos proponemos continuar dicha colaboración.

6. REFERENCIAS

Benyahia S, Benayache S, Benayache F, León F, Quintana J, López M, Hernández JC, Estévez F, Bermejo J. "Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity" *Phytochemistry* (2005) Vol 66, 627.

Benyahia S, Benayache S, Benayache F, Quintana J, López M, León F, Hernández JC, Estévez F, Bermejo J. "Isolation from *Eucalyptus occidentalis* and Identification of a New Kaempferol Derivative that Induces Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells" *Journal of Natural Products* (2004), Vol 67, 527.

Bohlin L. "The ABC of phytochemistry" *Trens in Plants Science* (1998), Vol 3 (11), 449.

Boudjerda A, Zater H, Benayache S, Chalchat JC, González-Platas J, León F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. "A new guaianolide and other constituents from *Achillea ligustica*" *Biochemical Systematics and Ecology* (2008) Vol 36, 461

Bremer K, Humphries CJ. "Generic monograph of the Asteraceae-Anthemideae" *Bulletin of the Natural History Museum of London* (Botany) (1993) Vol 23, 71.

Djema A, Messaoudene M. "The Algerian forest: Current situation and prospects" in Modeling, Valuing and Managing Mediterranean Forest Ecosystems for Non-Timber Goods and Services. Ed. European Forest Institute, EFI Proceedings, Finland **2009**, Nº 57, p.17-28.

Franco-Molano AE, Corrales A, Vasco-Palacios AM. "Macrofungi of Colombia II. Checklist of the Species of Agaricales, Boletales, Cantharellales and russulales (Agaricomycetes, Basidiomycota)" *Actual Biol* (2010) Vol 32, 89.

González AG, León F, Hernández JC, Padrón JI, Sánchez-Pinto L, Bermejo J. "Flavans of dragon's blood from *Dracaena draco* and *Dracaena tamaranae*" *Biochemical Systematics and Ecology* (2004) Vol 32, 179.

Hernández JC, León F, Brouard I, Torres F, Rubio S, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. "Synthesis of novel spirostanic saponins and their cytotoxic activity" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2008) Vol 16, 2063.

Hernández JC, León F, Estévez F, Quintana J, Bermejo J. "A Homo-Isoflavonoid and a Cytotoxic Saponin from *Dracaena draco*" *Chemistry & Biodiversity* (2006) Vol. 3, 62.

Hernández JC, León F, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. "Icogenin, a new cytotoxic steroidal saponin isolated from *Dracaena draco*" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2004) Vol 12, 4423.

Koehn FE, Newman DJ. "Drug discovery from Natural products" *Nature Reviews Drugs Discovery* (2009), Vol 8, 678.

Kunkel G, Beltrán E, Afonso J, Bañares A, Gil MC, González MN, González JM, Haroun RJ, Hernández C, Losada A, Marrero A, Rodríguez JL, Rodrigo J. "Flora del Archipiélago Canario" Tratado florístico, primera parte, Edirca S.L. Las Palmas de Gran Canaria, **1992**.

León F, Brouard I, Rivera A, Torres F, Rubio S, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. "Isolation, Structure Elucidation, Total Synthesis, and Evaluation of New Natural and Synthetic Ceramides on Human SK-MEL-1 Melanoma Cells" *Journal of Medicinal Chemistry* (2006) Vol 49, 5830.

León F, Brouard I, Torres F, Quintana J, Rivera A, Estévez F, Bermejo J. "A New ceramide from *Suillus luteus* and its Cytotoxic Activity against Human Melanoma Cells" *Chemistry & Biodiversity* (2008) Vol 5, 120.

León F, Quintana J, Rivera A, Estévez F, Bermejo J. "Lanostanoid Triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and Apoptosis Induction on HL-60 Human Myeloid Leukemia Cells" *Journal of Natural Products* (2004), Vol 67, 2008.

León F, Valencia M, Rivera A, Nieto I, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. "Novel Cytostatic Lanostanoid Triterpenes from *Ganoderma australe*" *Helvetica Chimica Acta* (2003) Vol 86, 3088.

Marrero A, Almeida R, González-Martín M. "A new species of dragon tree from Gran Canaria and its taxonomic and biogeographical implications". *Botanical Journal Linnean Society* (1998) Vol 128, 291.

Oberprieler C, Himmelreich S, Vogt R. "A new subtribal classification of the tribe Anthemideae (Compositae)" *Willdenowia* (2007) Vol 37, 89.

Paterson RRM. "Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory" *Phytochemistry* (2006) Vol 67, 1985.

Sánchez-Pinto L. "El drago del Atlas" *Makaronesia*, (2001) Vol 3, 30.

Santos A. "Arboles de Canarias" Editorial Interinsular Canaria, S.A., Santa Cruz de Tenerife, **1979**, 47.

Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J, Benayache F. "A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*" *Phytochemistry Letters* (2009) Vol 2, 114.

Triana J, Eiroa JL, Ortega JJ, León F, Brouard I, Hernández JC, Estévez F, Bermejo J. "Chemotaxonomy of *Gonospermum* and related genera" *Phytochemistry* (2010) Vol 71, 627.

Triana J, Eiroa JL, Ortega JJ, León F, Brouard I, Torres F, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. "Sesquiterpene Lactones from *Gonospermum gomerae* and *G. fruticosum* and Their Cytotoxic Activities" *Journal of Natural Products* (2008), Vol 71, 2015.

Triana J, López M, Pérez FJ, González-Platas J, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J. "Sesquiterpenoids from *Pulicaria canariensis* and Their Cytotoxic Activities" *Journal of Natural Products* (2005), Vol 68, 523.

Triana J, López M, Rico M, González-Platas J, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J. "Sesquiterpenoid Derivatives from *Gonospermum elegans* and Their Cytotoxic Activity for HL-60 Human Promyelocytic Cell" *Journal of Natural Products* (2003), Vol 66, 943.

Zaiter L, Bouheroum M, Benayache S, Benayache F, León F, Brouard I, Quintana J, Estévez F, Bermejo J. "Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla* L" *Biochemical Systematics and Ecology* (2007) Vol 35, 533.